基于 SAFLP 的我国常见索线虫科昆虫病原线虫亲缘关系分析

姜爱兰[#]，饶祥军[#]，贺俊飞，王国秀[*]
（华中师范大学生命科学学院，武汉 430079）

摘要：本研究建立并优化了索线虫科（Mermithidae）SAFLP 体系，构建了我国常见索线虫科昆虫病原线虫 6 属 11 种/亚种的指纹图谱。采用 *Eco*RⅠ和 *Mse*Ⅰ两种限制性内切酶单酶切，结果显示 *Eco*RⅠ酶更适合作为索线虫科线虫 SAFLP 的内切酶。3 个带有 3 个选择性碱基的 *Eco*RⅠ引物进行扩增共得条带 225 个，片段大小为 250～1 650 bp。通过 NTsys-PC2.1 软件计算了索线虫科 6 属 11 种/亚种的 Nei-Li 遗传距离（0.1980～0.4554）和相似系数，利用 NTsys-PC2.1 软件中的 UPGMA 方法构建其聚类图。索线虫科这 6 属 11 种/亚种从属级阶元可以分为两大类群：罗索属 *Romanomermis* 和八腱索属 *Octomyomermis* 聚为一支构成第一大类群；六索属 *Hexamermis* 与卵索属 *Ovomermis* 先聚在一起然后与多索属 *Agamermis* 聚在一起，再与两索属 *Amphimermis* 聚在一起构成第二大类群。在八腱索属和两索属中属内不同种/亚种间线虫采集地相距较近的其遗传距离较近。优化的索线虫科线虫 SAFLP 体系能够反映索线虫科线虫种属间的亲缘关系，并与形态学的研究结果基本相符，可以用于属种的分类和亲缘关系的研究。

关键词：昆虫病原线虫；索线虫科；SAFLP；聚类图；亲缘关系；中国
中图分类号：Q959；Q75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)09-0924-06

Phylogenetic relationships among common species of Mermithidae (Nematoda) in China based on SAFLP

JIANG Ai-Lan[#], RAO Xiang-Jun[#], HE Jun-Fei, WANG Guo-Xiu[*] (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The method of SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) was optimized for Mermithidae in this study. The genetic relationships among 11 species or subspecies belonging to six genera of Mermithidae and common in China were detected using this method. Two kinds of restriction endonucleases were used in this study, and the results showed that *Eco*RⅠ was more suitable than *Mse*Ⅰ for SAFLP analysis of Mermithidae. In total 225 bands (form 250 to 1 650 bp) were amplified using three *Eco*RⅠ primers each with three selective bases. Nei's similarity coefficients and genetic distance (0.1980－0.4554) were calculated by NTsys-PC2.1 software and the phylogenetic tree was constructed with the method of UPGMA. The results indicated that the eleven species/subspecies of Mermithidae could be distinguished with SAFLP markers and were grouped into two distinct clusters. Two major groups of genera are observed in the phylogenetic tree: *Romanomermis* + *Octomyomermis*; ((*Hexamermis* + *Ovomermis*) + *Agamermis*) + *Amphimermis*. Comparatively, the genetic distance of different species or subspecies, which are from closer area in the same genera, is smaller in *Octomyomermis* and *Amphimermis*. The result of this experiment is similar to that of the morphologic taxonomy system and provides further evidence for the studies of phylogenetic relationship among species or genera of Mermithidae. The results suggest that this optimized SAFLP is suitable for analysis of phylogenetic relationship and taxonomy among species of Mermithidae.

基金项目：国家自然科学基金项目（30870350）；教育部科学技术研究重点项目（[2006]52：106117）

作者简介：姜爱兰，女，1982 年生，山东汶上人，硕士研究生，研究方向为动物生化与分子生物学，E-mail：jiangjing925@yahoo.com.cn；饶祥军，男，1982 年生，湖北黄冈人，硕士研究生，研究方向为动物生化与分子生物学，E-mail：raoxiangjun@yahoo.com.cn
并列第一作者 Authors with equal contribution
* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：13871203272；E-mail：wangguoxiu@yahoo.com.cn

收稿日期 Recevied：2008-04-09；接受日期 Accepted：2008-06-20

Key words: Entomopathogenic nematodes; Mermithidae; SAFLP; phylogenetic tree; phylogenetic relationship; China

索线虫科(Mermithidae)属于线虫动物门(Nematoda)无尾感器纲(Aphasidia)嘴刺目(Enoplida)索线虫总科(Mermithoidea)，广泛寄生于农林及卫生害虫体内，其寄生率即等于害虫的死亡率，并可在自然界中再循环，是一类宝贵的昆虫天敌资源(Poiner，1975; 王茂先等，2004)。索线虫科的寄生宿主范围广，生态环境和地理分布差异较大，生活史复杂，由于寄主营养、环境温度和感染强度等因素不同，即使同种不同个体间在形态特征上也可能存在一些差异，某些属级的分类仍有争议。目前，国际上存在以前苏联 Rubzov (1991) 和 Gafurov (1996)以及美国 Poiner (1979) 为代表的三大索线虫科形态学分类系统，这三大分类系统对索线虫科属或亚科的分类性状描述存在一定差异，并且对索线虫科属/种间亲缘关系也没有明晰的描述。因此，研究索线虫科线虫的遗传背景，正确鉴定线虫种类或品系，分析不同种类线虫之间的亲缘关系，对于线虫的实际应用具有十分重要的意义。

目前，国外对昆虫病原索线虫科线虫种和属间的分子系统学研究还未见报道，国内仅本研究室徐芬等(2005)通过随机扩增多态性(RAPD)标记从分子生物学的角度对 4 属 5 种索线虫科线虫进行了系统演化研究，汪江一等(2007)通过分子生物学方法对中国常见 6 属 10 种索线虫科线虫的 18S rDNA，28S rDNA 和 COⅠ(细胞色素氧化酶Ⅰ基因)基因序列进行了分析，构建了系统进化树，探讨了其系统演化关系。然而以上方法仍不能完全清晰地揭示索线虫科线虫的亲缘关系，并与形态学的某些研究结果不符，因此需要采用更多的方法和途径对此进行探讨。本文首次将 SAFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism)技术应用于昆虫病原索线虫科线虫亲缘关系研究，优化的索线虫科线虫 SAFLP 体系能够反映索线虫科线虫种属间的亲缘关系，并与形态学的研究结果基本相符。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism，AFLP)是 Vos 等(1995)报道的一种基于 PCR 技术和 RFLP 技术的高效 DNA 多态性检测技术。AFLP 技术具有高效性、可靠性、重复性好、可在不知道基因组序列情况下进行研究、多态性检出率高、快速等优点，这些特点使 AFLP 已用于一般分子标记的所有应用范围(Qi and Lindhout，1997; Keim *et al*.，1997; Liu *et al*.，1998)。在线虫领域，已经被广泛应用于动、植物寄生线虫的遗传图谱构建(Rouppe *et al*.，1999)、遗传多样性分析(Otsen *et al*.，2000)、分类(Semblat *et al*.，1998)等方面。在 AFLP 基础上改进的 SAFLP 技术，采用单限制酶酶切，得到长度较大的片段，用琼脂糖电泳即可分离检测，这种经过改进方法比传统的 AFLP 方法具有更多的优点(Gaafar *et al*.，2003)，更为经济、方便。本实验建立并优化了索线虫科线虫的 SAFLP 体系，首次对 6 属 11 种/亚种索线虫科线虫的遗传多样性和亲缘关系进行研究。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　实验材料

供试线虫标本来源及处理方法见表 1。

表 1　用于 SAFLP 研究的索线虫科线虫样品

Table 1　Mermithidae samples for the SAFLP study

种名 Species	代码 Code	来源 Locality	保存方式 Storage	泳道序号 Lane no.
中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis*	OSI	河南上蔡 Shangcai，Henan	Ⅰ	1
食蚊罗索线虫 *Romanomermis culicivorax*	RCU	美国 USA	Ⅰ	2
武昌罗索线虫 *R. wuchangensis*	RWU	湖北武汉 Wuhan，Hubei	Ⅰ	3
地老虎六索线虫 *Hexamermis agrotis*	HAG	陕西西安 Xi'an，Shaanxi	Ⅱ	4
八腱索线虫未定种 A *Octomyomermis* sp. A	OCA	广东徐闻 Xuwen，Guangdong	Ⅱ	5
华中八腱索线虫 *O. huazhongensis*	OCB	湖北五里界 Wulijie，Hubei	Ⅱ	6
八腱索线虫未定种 C *Octomyomermis* sp. C	OCC	湖北洪湖 Honghu，Hubei	Ⅱ	7
两索线虫未定种 A *Amphimermis* sp. A	AMA	广西玉林 Yulin，Guangxi	Ⅱ	8
两索线虫未定种 B *Amphimermis* sp. B	AMB	广东徐闻 Xuwen，Guangdong	Ⅱ	9
两索线虫未定种 C *Amphimermis* sp. C	AMC	湖北枣阳 Zaoyang，Hubei	Ⅱ	10
长沙多索线虫 *Agamermis changshaensis*	ACH	湖北枣阳 Zaoyang，Hubei	Ⅱ	11

Ⅰ: 4℃活体冷藏 Living samples stored at 4℃; Ⅱ: 95%乙醇固定 Ethanol (95%) fixed samples.

1.2 线虫基因组 DNA 提取

参照徐芬等(2005)的方法提取线虫基因组 DNA。分光光度计测定线虫基因组 DNA OD_{260}/OD_{280} 值,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

1.3 酶切连接及 SAFLP 模板 DNA 的制备

线虫基因组 DNA 用 *Eco*RⅠ酶和 *Mse*Ⅰ酶单酶切。20 μL 酶切体系,含有线虫基因组 DNA 250 ng 左右,*Eco*RⅠ内切酶或 *Mse*Ⅰ内切酶(立陶宛 MBI Fermentas 公司产品)2 μL,10×Buffer *Eco*RⅠ或 10×Buffer *Mse*Ⅰ 2 μL。37℃恒温水浴,酶切过夜。单酶切完成后,加入 20 μL 连接混合液(包含 4 μL T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司产品),10×T4 DNA 连接酶 Buffer 4 μL,*Eco*RⅠ 接头或 Mse Ⅰ接头 4 μL (5 μ mol/L)),16℃连接过夜。

1.4 SAFLP PCR 反应体系和扩增程序

所有 PCR 反应均在 Eppendorf AG(德国 Eppendorf 公司)PCR 仪上完成。反应总体积为 20 μL,含 Taq 酶(TaKaRa 公司产品)1 μL,10 × PCR Buffer,单酶切后连接好接头的模板 DNA 4 ng,$MgCl_2$ 1.0~3.0 mmol /L,dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.1~0.3 mmol/L,SAFLP 引物 60~140 ng。PCR 扩增程序为:94℃预变性 4 min,接着 94℃ 30 s,初始复性温度 65℃ 1 min,72℃ 1.5 min,然后每个循环复性温度降低 1℃至 56℃,再接着以 94℃ 30 s,56℃ 1 min,72℃ 1.5 min 25 个循环,最后 72℃延伸 10 min。先以不加选择性碱基 *Eco*RⅠ引物和 *Mse*Ⅰ引物进行预扩增,将预扩增产物稀释 10 倍作为模板,分别用带有 1 个、2 个和 3 个选择性碱基的 *Eco*RⅠ引物和 *Mse*Ⅰ引物进行选择性扩增,然后以筛选出的多态性好的 3 个带 3 个选择性碱基的 *Eco*RⅠ引物(5′-GACTGCGTACCAATTCATG-3′, 5′-GACTGCGTACCAATTCACA-3′, 5′-GACTGCGTACCAATTCAAC-3′)进行扩增。

1.5 电泳检测

取扩增后的 PCR 产物 6 μL,上样于 1.5%琼脂糖凝胶中,1×TAE 电泳缓冲液,5 V/cm 的恒压电泳 3 h 左右,0.01% EB(溴化乙锭)染色 30 min,用 Gel-PRO ANALYZER 凝胶成相系统(美国)照相。

1.6 数据处理

通过 Syngene GeneTools 分析 SAFLP 扩增结果,以"1"代表存在条带,以"0"代表没有条带,将图形资料转化成数据资料。然后通过 NTsys-PC2.1 软件计算 6 属 11 种/亚种索线虫科线虫的 Nei-Li 遗传距离和相似系数,采用 UPGMA 方法构建其系统树。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应体系的优化和扩增

分别对 Mg^{2+}、dNTPs 和引物三个因素设定不同的浓度梯度并进行 PCR 扩增,从结果得知当 Mg^{2+} 浓度在 1.5 mmol/L,4 种 dNTPs 浓度在 0.25 mmol/L,引物浓度为 80~100 ng 时扩增效果较理想。以带有 1 个、2 个选择性碱基的 *Eco*RⅠ和 *Mse*Ⅰ引物以及带有 3 个选择性碱基的 *Mse*Ⅰ引物进行扩增,电泳结果表现为弥散状,得不到明显的条带;以筛选出的多态性好的 3 个带 3 个选择性碱基 *Eco*RⅠ引物进行扩增,结果得到片段大小为 250~1 650 bp 的条带

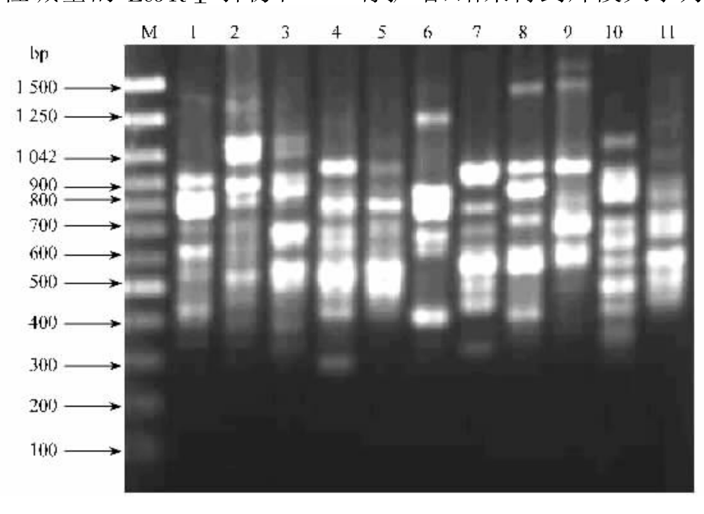


图 1 11 种/亚种索线虫科线虫基因组 DNA 用引物 E/ATG 扩增的产物电泳图

Fig. 1 SAFLP amplified profiles of eleven species/subspecies of Mermithidae generated with primers E/ATG

泳道序号 1~11 参见表 1;M:分子量标准。The materials of lane no. 1-11 are as described in Table 1. M: DNA marker.

225 个，表现出很高的多态性。在 *Eco*RⅠ酶和 *Mse*Ⅰ酶两种酶中，*Eco*RⅠ酶更适合作为索线虫科线虫 SAFLP 的内切酶。部分引物的扩增结果见图 1。

2.2　11 种/亚种索线虫科线虫 SAFLP 多态性和亲缘关系分析

通过 NTsys-PC2.1 软件计算 6 属 11 种/亚种索线虫科线虫的 Nei-Li 遗传距离和相似系数（表 2）。采用 UPGMA 方法构建系统树（图 2）。6 属 11 种/亚种索线虫科线虫从属级阶元可以分为两大类群：罗索属和八腱索属聚为一支构成第一大类群；六索属与卵索属先聚在一起然后与多索属聚在一起，再与两索属聚在一起构成第二大类群。

表 2　11 种/亚种索线虫科线虫之间的相似系数（下三角）和遗传距离（上三角）

Table 2　The genetic identity（lower triangle）and genetic distance（upper triangle）among 11 species/subspecies of Mermithidae

代码 Code	OSI	RCU	RWU	HAG	OCA	OCB	OCC	AMA	AMB	AMC	ACH
OSI		0.4554	0.4532	0.2455	0.4059	0.3960	0.3874	0.3168	0.3129	0.3206	0.2864
RCU	0.5446		0.1980	0.4387	0.2901	0.2772	0.2871	0.3465	0.3378	0.3428	0.3666
RWU	0.5468	0.8020		0.4299	0.2687	0.2579	0.2970	0.3408	0.3476	0.3416	0.3631
HAG	0.7545	0.5613	0.5701		0.4059	0.4158	0.4208	0.3079	0.3109	0.3235	0.2970
OCA	0.5941	0.7099	0.7313	0.5941		0.3267	0.3465	0.3571	0.3508	0.3469	0.3458
OCB	0.6040	0.7228	0.7421	0.5842	0.6733		0.2574	0.3407	0.3498	0.3483	0.3366
OCC	0.6126	0.7129	0.7030	0.5792	0.6535	0.7426		0.3493	0.3400	0.3465	0.3499
AMA	0.6832	0.6535	0.6592	0.6921	0.6429	0.6593	0.6507		0.2913	0.3492	0.3069
AMB	0.6871	0.6622	0.6524	0.6891	0.6492	0.6502	0.6600	0.7087		0.3466	0.3187
AMC	0.6794	0.6572	0.6584	0.6765	0.6531	0.6517	0.6535	0.6508	0.6537		0.3281
ACH	0.7136	0.6334	0.6369	0.7030	0.6542	0.6634	0.6501	0.6931	0.6813	0.6719	

代码同表 1。Codes as in Table 1.

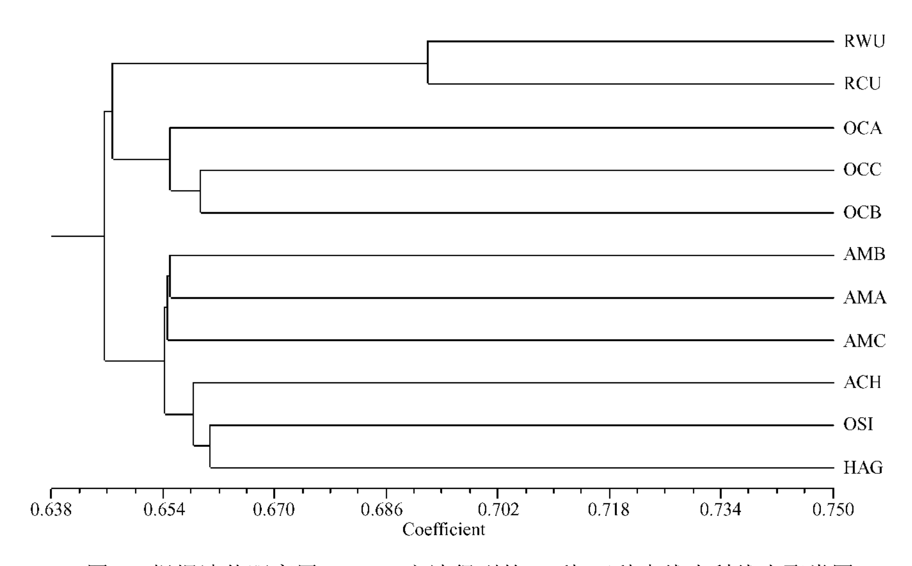


图 2　根据遗传距离用 UPGMA 方法得到的 11 种/亚种索线虫科线虫聚类图

Fig. 2　Dendrograms of eleven species/subspecies of Mermithidae based on the genetic distance matrices using the method of UPGMA

代码同表 1。Codes as in Table 1.

3　讨论

单限制性内切酶的选择是 SAFLP 标记实验成功的关键之一。本实验首先采用 *Eco*RⅠ酶和 *Mse*Ⅰ酶两种限制性内切酶进行酶切的结果看出两者都能酶切完全，但是扩增的效果却相差很大。*Eco*RⅠ酶切后扩增能得到很好的多态性条带，而 *Mse*Ⅰ酶切后扩增始终得不到清晰的条带。因此，线虫 SAFLP 体系中采用 6 碱基识别位点的低频剪切酶 *Eco*RⅠ酶更为合适。

本实验建立并优化了索线虫科线虫 SAFLP 体系，对 6 属 11 种/亚种索线虫科线虫进行研究，探讨 6 属索线虫科线虫间的亲缘关系。研究结果表明索线虫科这 6 属 11 种/亚种从属级阶元可以分为两大类群（亚科），并与 Gafurov（ 1997 ）的形态学研究结果相近。

Gafurov（1997）认为：六索属、多索属和两索属线虫角皮内有交叉纤维，纵索 6 条，大多寄生于陆生昆虫，共同归属于多索线虫亚科（Agamermithinae）；

而八腱索属和罗索属线虫角皮内没有交叉纤维，纵索 8 条，通常寄生于水生昆虫，归属到中索线虫亚科（Mesomermithinae）。依据 Robzov（1991）的形态分类系统：两索属线虫属于两索线虫亚科（Amphimermithinae），其主要特征为交接刺 2 根、较长超过体直径的 2～4 倍（两端扭曲），阴门斜，阴道圆柱状、长 S 形弯曲；另外，将卵索属从六索属中独立出来，既六索属、卵索属、多索属同属于六索线虫亚科（Hexamermithinae），卵索属与六索属线虫有许多相似的形态特征，但也有不同之处，如侧器孔与侧乳头的相对位置不同等；六索属与多索属也比较接近，主要区别是多索属线虫寄生后期幼虫尾部有一自切疤痕而无角质附属物，以及感染期幼虫在体后区有一“结”，进入宿主时虫体从结处自动断裂，后端弃留在宿主体外；八腱索属和罗索属同属于宽索线虫亚科（Eurymermithinae），都可以寄生在蚊幼虫体内。其中武昌罗索线虫的宿主为库蚊（如三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 等）和伊蚊（埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 等）、食蚊罗索线虫和八腱索属线虫的宿主除了库蚊和伊蚊外还有按蚊（如淡色按蚊 *Anopheles albimanus*，中华按蚊 *An. sinensis* 等）（Poiner，1979；Nickle，1984；Robzov，1991）。Poiner（1979）分类系统中没有分亚科，直接分为六索属、多索属、两索属、八腱索属和罗索属，其中六索属、多索属、两索属亲缘关系较近，八腱索属和罗索属亲缘关系较近。在 Gafurov（1997）和 Poiner（1979）分类系统中都没有提到卵索属。

SAFLP 研究结果表明罗索属和八腱索属亲缘关系较近，聚在一起构成一个大类群；卵索属与六索属亲缘关系最近，先聚在一起，然后与多索属聚在一起，最后与两索属聚在一起构成另一个大类群。RAPD 研究结果（徐芬等，2005）显示罗索属与多索属聚在一起构成一支，卵索属与两索属聚在一起构成另一支；汪江一等（2007）的研究结果显示罗索属与两索属亲缘关系最近，先聚在一起，构成第一大类群，然后卵索属与六索属聚在一起，再与多索属聚在一起，最后与八健索属聚在一起构成第二大类群。SAFLP 研究结果与 Gafurov（1997）形态学分类具有很大的一致性，印证了形态学分类，但与 RAPD 研究结果（徐芬等，2005）和汪江一等（2007）研究结果存在一定的差异。

食蚊罗索线虫（美国）和武昌罗索线虫（中国）同属于罗索属，两者的形态特征相似（仅武昌罗索线虫体长和交合刺之比为 35.7，与食蚊罗索线虫的 25 相差较大），但食蚊罗索线虫可以感染按蚊、而武昌罗索线虫则不能。最近的研究表明，雌性武昌罗索线虫与雄性食蚊罗索线虫交配可以产卵、但卵不能继续发育，而雄武昌罗索线虫与雌食蚊罗索线虫配对则没有成功（另文发表），证明食蚊罗索线虫与武昌罗索线虫属于不同的物种。SAFLP 结果显示食蚊罗索线虫与武昌罗索线虫共有条带达 40%、其遗传距离为 0.1980，从 UPGMA 聚类图上看两者亲缘关系最近，但两者之间仍然存在一些差异。其研究结果与形态学和生物学研究以及 RAPD 实验、汪江一等研究结果一致。

采于湖北洪湖和五里界的八腱索属线虫（OCC 与 OCB）间遗传距离较小，为 0.2574，先聚在一起，然后与采于广东徐闻的八腱索属线虫（OCA）聚在一起，OCA 与 OCB 和 OCC 的遗传距离分别为 0.3267 和 0.3465。采于广西玉林和广东徐闻的两索属线虫（AMA 和 AMB）间遗传距离较小为 0.2913，先聚在一起然后再与采于湖北枣阳的两索属线虫（AMC）聚在一起，AMC 与 AMA 和 AMB 的遗传距离分别为 0.3492 和为 0.3466。3 种八腱索属线虫之间以及 3 种两索属线虫之间，形态学特征差异不明显，尚不能通过一般的形态学研究进行区分。SAFLP 结果显示 3 种八腱索属线虫之间以及 3 种两索属线虫之间的遗传距离都比食蚊罗索线虫与武昌罗索线虫的遗传距离（0.1980）大，初步判断它们是不同的种或亚种。本研究室其他小组正在进行 3 种八腱索属线虫和两索属线虫的电镜形态观察和生物学特性的比较研究以及通过其他分子标记进行区分和鉴定（另文发表）。从地理位置上看洪湖和五里界同在湖北省境内，两地的距离远远小于与广东徐闻的距离。广西玉林和广东徐闻位于广西省和广东省两省交界处，地理位置比邻，两地之间的距离远远小于和湖北枣阳之间的距离。这几种/亚种线虫的亲缘关系表现为线虫采集地地理位置相隔较近，同属不同种/亚种线虫之间遗传距离较小，亲缘关系也较近，反之亦然。

SAFLP 技术是一种简便、快捷、经济、高效的分子标记技术，本实验研究结果表明优化的索线虫科线虫 SAFLP 体系不仅能够反映索线虫科线虫属/种间的遗传多样性和亲缘关系，与其他方法（徐芬等，2005；汪江一等，2007）相比还能反映出地理分布不同的同种个体间的亲缘关系。该方法将更广泛地用于索线虫科线虫的遗传背景、分类、未知种的鉴定、遗传多样性和亲缘关系等方面的研究。

参 考 文 献（References）

Gaafar A，Unzaga MJ，Cisterna R，Clavo FE，Urra E，Ayarza R，Martín G，2003. Evaluation of a modified single-enzyme amplified-fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolate. *J. Clin. Microbiol.*，41：3 846 – 3 850.

Gafurov AK，1996. Mermithidae：Systematics，Biology，Phylogeny，Practical Significance. Publishing House "Donish"，Dushanbe. 241 – 259.

Keim P，Schupp JM，Travis SE，Clayton K，Zhu T，Shi L，Ferreira A，Webb DM，1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Science*，37(2)：537 – 543.

Liu Z，Nichols A，LiP，Dunham RA，1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish（*Ictalurus punctatus*），blue catfish（*I. furcatus*），and their F1，F2，and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.*，258：260 – 268.

Nickle WR，1984. Plant and Insect Nematodes. Marcel Dekker，New York and Basel. 797 – 820.

Otsen M，Plas ME，Groeneveld J，Roos MH，Lenstra JA，Hoekstra R，2000. Genetic markers for the parasitic nematode *Haemonchus contortus* based on intron sequences. *Exp. Parasitol.*，95(3)：226 – 229.

Poinar GOJr，1975. Entomogenous Nematodes. E. J. Brill，Leiden. 1 – 96.

Poinar GOJr，1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press，Boca Raton，Florida. 1 – 198.

Qi X，Lindhout P，1997. Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.*，254(3)：330 – 336.

Robzov IA（Translated by Pan CS），1991. Mermithidae：Taxonomy，Role，Application. Science Press，Beijing. 1 – 74.［鲁布佐夫（潘沧桑译），1991. 索科线虫——分类•作用•应用. 北京：科学出版社. 1 – 74］

Rouppe van der Voort JN，Van Eck HJ，van Zandvoort PM，Overmars H，Helder J，Bakker J，1999. Linkage analysis by genotyping of sibling populations：a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a "pseudo-F2" mapping strategy. *Mol. Gen. Genet.*，261(6)：1 021 – 1 031.

Semblat JP，Wajnberg E，Dalmasso A，Abad P，Castagnone-sereno P，1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Mol. Ecol.*，7(1)：119 – 125.

Vos P，Hogers R，Bleeker M，Reijans M，van de LT，Hornes M，Frijters A，Pot F，Peleman J，Kuiper M，Zabeau M，1995. AFLP：a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*，23：4 407 – 4 414.

Wang JY，Xu F，Liu XS，Wang GX，2007. Molecular phylogeny of entomopathogenic nematodes（Mermithidae）inferred from DNA sequences of 18S rDNA，28S rDNA and COI genes. *Acta Zoologica Sinica*，53(5)：835 – 844.［汪江一，徐芬，刘绪生，王国秀，2007. 基于部分 18S rDNA，28S rDNA 和 COI 基因序列的索科线虫亲缘关系. 动物学报，53(5)：835 – 844］

Wang MX，Wang GX，Li ZQ，Li Y，Yang HL，2004. Change in the content of free amino acids in haemolymph of *Helicoverpa armigera* infected by *Ovomermis sinensis*（Nematode）. *Acta Entomol. Sin.*，47(2)：277 – 280.［王茂先，王国秀，李志强，李扬，杨红丽，2004. 棉铃虫感染中华卵索线虫后血淋巴游离氨基酸含量的变化. 昆虫学报，47(2)：277 – 280］

Xu F，Wang GX，Zha YP，Liu P，Cao WB，Liu XS，2005. Genetic relationships among five species of Mermithidae based on RAPD. *Zool. Res.*，26(3)：294 – 299.［徐芬，王国秀，查玉平，刘朋，曹文博，刘绪生，2005. 五种索科线虫 RAPD 亲缘关系分析. 动物学研究，26(3)：294 – 299］

（责任编辑：袁德成）